

Identification of microorganisms, especially respiratory tract pathogens

Publication number: DE19716456

Publication date: 1998-10-22

Inventor: SCHMITT HEINZ-JOSEF PROF DR (DE)

Applicant: SCHMITT HEINZ JOSEF PROF DR (DE)

Classification:

- **international:** C12Q1/68; C12Q1/70; C12Q1/68; C12Q1/70; (IPC1-7):
C12Q1/68; C12Q1/04

- **European:** C12Q1/68M6B; C12Q1/70B

Application number: DE19971016456 19970421

Priority number(s): DE19971016456 19970421

[Report a data error here](#)

Abstract of DE19716456

Process for identification of microorganisms, especially infectious disease pathogens, comprises (1) performing a simultaneous amplification of several target sequences (multiplex polymerase chain reaction) in which a patient sample is contacted with a solution containing several primers and where a part of the sample has been subjected to a previous reverse transcription for only one RNA-possessing pathogen; (2) the PCR product is subjected to digoxigenin-labelling with selected probes corresponding to the primers; and (3) obtaining data on the presence of a microorganism (relating to the primer) by capture sample-evaluation and/or photometrically measurable colour value variation of the sample.

Data supplied from the **esp@cenet** database - Worldwide



⑯ BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

⑫ Patentschrift
⑯ DE 197 16 456 C 2

⑮ Int. Cl. 7:
C 12 Q 1/68
C 12 Q 1/04

⑯ Aktenzeichen: 197 16 456.0-41
⑯ Anmeldetag: 21. 4. 1997
⑯ Offenlegungstag: 22. 10. 1998
⑯ Veröffentlichungstag der Patenterteilung: 8. 5. 2002

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

DE 197 16 456 C 2

⑰ Patentinhaber:
Schmitt, Heinz-Josef, Prof. Dr., 24105 Kiel, DE
⑰ Vertreter:
BOEHMERT & BOEHMERT, 24105 Kiel

⑰ Erfinder:
gleich Patentinhaber
⑯ Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
WO 95 13 396 A2
Chemical Abstracts 124 (1996):221903c;
Chemical Abstracts 123 (1995):161942g;
Chemical Abstracts 115 (1991):130899d;

- ⑯ Verwendung einer Kombination von Primern zum Nachweis von Erregern von Infektionskrankheiten
 ⑯ Verwendung einer Kombination von Primern in einem Multiplex-PCR-Verfahren zum Nachweis von Erregern von Infektionskrankheiten, zur gleichzeitigen Amplifikation mehrerer Zielsequenzen in einem Reaktionsgefäß, in dem eine Patientenprobe mit einer aus einer Mehrzahl von Primern bestehenden Primerlösung in Kontakt gebracht wird, eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) veranlaßt wird, und eine Digoxigenin-Markierung vorgenommen wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Kombination Primer mit folgenden Sequenzen aufweist:
 "Enterovirus"
 EV1 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3'
 EV2 5'-TCC TCC GGC CCC TGA ATG CG-3'
 "Mycoplasma pneumoniae"
 MP1 5'-AAG GAC CTG CAA GGG TTC GT-3'
 MP2 5'-CTC TAG CCA TTA CCT GCT AA-3'
 "Influenzavirus Typ A"
 InfA NS1 5'-AAG GGC TTT CAC CGA AGA GG-3'
 InfA NS2 5'-CCC ATT CTC ATT ACT GCT TC-3'
 "Influenzavirus Typ B"
 InfB NS1 5'-ATG GCC ATC GGA TCC TCA AC-3'
 InfB NS2 5'-TGT CAG CTA TTA TGG AGC TG-3'
 "Adenovirus"
 Adh1 5'-GCC GAG AAG GGC GTG CGC AGG TA-3'
 Adh2 5'-ATG ACT TTT GAG GTG GAT CCC ATG GA-3'
 "Chlamydia pneumoniae"
 CpnA 5'TGA CAA CTG TAG AAA TAC AGC-3'
 CpnB 5'CGC CTC CCT ATA AAT-3'
 "Parainfluenzavirus Typ 1"
 PIV1 1 5'-CAC ATC CTT GAG TGA TTA AGT TTG ATG A-3'
 PIV1 2 5'-ATT TCT GGA GAT GTC CCG TAG GAG AAC-3'
 "Parainfluenzavirus Typ 3"
 PIV3 1 5'-TAG CAG TAT TGA AGT TGG CA-3'

DE 197 16 456 C 2

DE 197 16 456 C 2

Beschreibung

- [0001] Die Erfindung betrifft die Verwendung einer Kombination von Primern um Nachweis von Erregern von Infektionskrankheiten nach dem Oberbegriff des Hauptanspruches.
- 5 [0002] Erreger von Infektionskrankheiten, insbesondere solchen des menschlichen Atmungstraktes, können insbesondere bei geschwächten Patienten (z. B. mit Herz-Kreislaufkrankheiten oder mit Krebs) besonders schwere Krankheitsverläufe auslösen. Aber auch schon "normale" Erkältungs-krankheiten sind die häufigsten Krankheiten bei Menschen schlechthin. Der dadurch bedingte Ausfall an Arbeit und Geld geht allein in der Bundesrepublik Deutschland jährlich in astronomische Höhen. Ursache sind verschiedene Mikroorganismen, die nur eine vergleichsweise geringe Anzahl anregen, weswegen immer wieder erneut solche Infektionen stattfinden können. Wenigstens ein Teil dieser Erreger ist heutzutage mit Antibiotika zu behandeln, wobei leider bisher nicht bekannt ist, wie man diese Erreger allein aufgrund der Symptome der Patienten voneinander unterscheiden könnte. Die bisher bekannten Methoden zum Nachweis der Erreger von Erkältungs-krankheiten sind extrem aufwendig, langwierig und teuer.
- 10 [0003] Zum einen ist die Kultur von geringer Praktikabilität, da das Ergebnis erst nach langer Zeit, wenigstens Tagen, meistens Wochen, vorliegt, sie extrem aufwendig und daher kostenintensiv ist und nicht zuletzt eine niedrige Sensitivität aufweist; die mittlere Liegezeit in der Pädiatrie beträgt drei bis fünf Tage, so daß der Patient in der Regel schon zu Hause ist, wenn der Erreger nachgewiesen wird. Für die akute Patientenversorgung ist die Kultur der Erreger daher unbrauchbar.
- 15 [0004] Die weiter bekannte Serologie, bei der ein Anstieg der Antikörper gegen einen Erreger beim Patienten untersucht wird, hat ebenfalls eine sehr lange Vorlaufzeit zur Bedingung. Man muß zwei Blutproben des Patienten, die mit einem Abstand von drei bis vier Wochen entnommen werden, vergleichen.
- 20 [0005] Für die Versorgung des Patienten ist es von entscheidender Bedeutung, daß der für den jeweiligen Erreger richtige Wirkstoff oder ggf. auch kein Antibiotikum eingesetzt wird. Weiter müssen im Krankenhaus je nach Erreger, der den Patienten infiziert hat, verschiedene Isolierungsmaßnahmen getroffen werden müssen, wie z. B. das Kohortieren von Patienten mit einem Erreger in einem Zimmer, die dann nur von einer Pflegekraft gepflegt werden. Es ist daher von großer Bedeutung, daß der jeweilige Erreger schnell erkannt wird.
- 25 [0006] Hierzu bietet sich das in der WO 95/13396 A2 noch für andere Mikroorganismen beschriebene Verfahren der Multiplex-PCR an. Aus der Zusammenfassung 'Chemical Abstracts 124' (1996): 221 903c ist zudem bekannt, daß bereits Adenoviren in einer Multiplex-PCR exprimiert werden können.
- 30 [0007] Versuche mit anderen Viren wie der in der Veröffentlichung L. A. Campbell 'Detection of Chlamydia pneumoniae by PCR', Journal of Clinical Microbiology, Feb. 1992, P. 434-439 ergeben jedoch, daß es große Probleme gibt, in einer Multiplex PCR gleichzeitig das Vorhandensein mehrerer Viren nachweisen zu können, da
- 35 - entweder ein Primer für einen Erreger andere Reaktionsbedingungen als die übrigen erfordert (er also z. B. bei der Temperatur der PCR, die für die anderen gewählt werden muß, zu geringe Amplifizierung zeigte)
 - sich Primer-Dimere anhäufen, die mit den Primern um Nukleotide und Polymerasen konkurrieren,
 - keine geeigneten Sonden zur Verfügung stehen, oder
 - die Größe der Amplifikate nicht derjenigen der anderen Primer entspricht, um eine einfache Auswertung zu erleichtern.
- 40 [0008] Weiter ist erwünscht, eine Mehrzahl zueinander passender Primer für Viren zu finden, die zu den gängigsten Erregern von Infektionskrankheiten gehören. Mit der sich ergebenden Anzahl von Viren vervielfacht sich die Zahl möglicher Probleme zu einem aussagekräftigen Zusammenspiel zu kommen, in Anbetracht der Vielzahl der jeweils zur Verfügung stehenden Möglichkeiten der Auswahl einer geeigneten Sequenz ins Unermessliche. Eine Möglichkeit der theoretischen Ableitung geeigneter Sequenzen besteht dabei aber nicht.
- 45 [0009] Der Erfolg liegt die Aufgabe zugrunde, eine aus der Vielzahl möglicher Primer-Kombinationen geschaffene Kombination zu finden, die ein schnelles Multiplex-PCR-Verfahren zum Nachweis der in Betracht kommenden Mikroorganismen ermöglicht.
- 50 [0010] Erfindungsgemäß wird dies durch die Verwendung einer Kombination mit den Merkmalen des Hauptanspruches gelöst. Der Unteranspruch gibt eine vorteilhafte Sondenkombination wieder.
- 55 [0011] Mit Hilfe der beschriebenen Polymerase-Kettenreaktion (PCR) gelingt es erstmals, auch Erreger des Respirationstraktes rasch und zuverlässig nachzuweisen. Dabei können gleichzeitig mehrere Zielsequenzen in einem Reaktionsgefäß amplifiziert werden (Multiplex-PCR). Es wird auf diese Weise möglich, epidemiologische Untersuchungen vorzunehmen, um herauszufinden, welche Erreger wie häufig in welcher Population Krankheiten des Respirationstraktes hervorrufen, und dem behandelnden Arzt innerhalb eines Arbeitstages mitzuteilen, ob der Patient von einer Behandlung mit einem bestimmten Antibiotikum profitiert oder nicht. Diese Entscheidung konnte in der Vergangenheit nicht adäquat getroffen werden, da keine objektive Entscheidungshilfe zur Verfügung stand.
- 60 [0012] Die hier zur Anwendung kommende diagnostische Multiplex-PCR ermöglicht es dagegen, eine Entscheidung bezüglich der Gabe von Antibiotika rasch aufgrund der aufgefundenen Erreger zu treffen. Z. B. sind Infektionskrankheiten durch Mycoplasmen oder Chlamydien mit einem Makrolidantibiotikum therapierbar, während es für die viralen Erreger bisher keine Therapie gibt. Wird kein Erreger nachgewiesen, so ist nach je nach klinischen Befunden eine bakterielle Genese zu vermuten, bei der man mit einem Beta-laktamantibiotikum (Pneumokokken, Haemophilus) behandeln muß.
- 65 [0013] Das bei der Realisierung insbesondere auftretende Problem, verschiedene Primer in einer Multiplex-PCR zu kombinieren, ist durch die beanspruchte Primer-Kombination nun gelöst.
- [0014] Dabei gibt die gewählte Auswahl wenigstens der Primer
- Chlamydia pneumoniae

DE 197 16 456 C 2

CpnA 5'-TGA CAA CTG TAG AAA TAC AGC-3',
 CpnB 5'-CGC CTC TCT CCT ATA AAT-3' und
 – *Mycoplasma pneumoniae*
 MP1 5'-AAG GAC CTG CAA GGG TTC GT-3',
 MP2 5'-CTC TAG CCA TTA CCT GCT AA-3'

5

einen Hinweis, ob mit einem Makrolidantibiotikum therapiert werden muß, und die Gesamtzahl der neun verschiedenen Primer CpnA,-B; MP1,-2; EV1,-2; RSV1,-2; InfA NS1, NS2; InfB NS1, NS2; Adh1,-2; PIV1 1, 2; PIV3 1, 3 erfaßt alle üblichen Erkältungskrankheiten, so daß bei einem negativen Befund auf eine bakterielle Genese rückgeschlossen werden kann.

10

[0015] Bei Auffinden lediglich der viralen Mikroorganismen ergibt sich zwar kein direkter Therapie-Hinweis aber epidemiologische Untersuchungen sowie entsprechende Kohortierung mit Patienten, die durch das gleiche Virus infiziert sind, werden möglich und krankenhausgeworbene Infektionen lassen sich vermeiden.

[0016] Weitere Merkmale und Vorteile der Erfindung ergeben sich aus nachfolgender Beschreibung einer bevorzugten Probenaufbereitung und der Durchführung des Verfahrens mit geeigneten Primern und Sonden.

15

[0017] In einer zunächst für die Versuche verwendeten Probenaufbereitung werden beispielsweise 100 µl Nasopharyngealsekret mit 100 µl 0,9% NaCl-Lösung verdünnt und mit 1 Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol in einer Zusammensetzung 25 : 24 : 1 in einer Endkonzentration von 0,1% SDS extrahiert. Nach einer 5-minütigen Zentrifugation auf einer Tischzentrifuge wird die obere wäßrige Phase abgehoben, mit Chloroform/Isoamylalkohol 24 : 1 ausgeschüttelt und 2 min zentrifugiert. Die Nukleinsäuren im Überstand werden mit 2,5 Volumen Ethanol bei einer Endkonzentration von 0,3 mol/l Natriumacetat für 5 min bei –70°C gefällt und 20 min abzentrifugiert. Das Pellet wird in 15 µl Diethylpyrocarbonat-behandeltem H₂O aufgenommen.

20

[0018] Anschließend werden hiervon 5 µl in einem 20 µl Reaktionsansatz mit 50 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3), 75 mmol/l KCl, 3 mmol/l MgCl₂, 10 mmol/l DTT, jeweils 1 mmol/l dATP, dCTP, dTTP und dGTP, 0,2 µg/µl Hexanucleotid-Mix, 20 E RNAsin und 10 E Mu-MLV Reverse Transcriptase (– jeweils Endkonzentrationen –) für 60 min bei 37°C revers transkribiert. Nach Hitzeinaktivierung des Enzyms für 5 min bei 90°C werden die 20 µl in der Multiplex-PCR eingesetzt.

25

[0019] Dort erfolgt in einem 80 µl Reaktionsansatz bei 10 mmol/l Tris-HCl (pH 8,3), 50 mmol/l KCl, 1,5 mmol/l MgCl₂, 0,001% Gelatine, jeweils 0,2 mmol/l dATP, dCTP und dGTP, 0,19 mmol/l dTTP, 0,01 mmol/l Digoxigenin-11-dUTP (Boehringer Mannheim), je 1 µmol/l jeder Primerlösung (s. u.) und 5 E AmpliTaq-Gold Polymerase (Perkin-Elmer) die PCR.

30

[0020] Die PCR-Reaktion erfolgt im Thermoblock eines PCR-Thermocyclers (PE 9600 Perkin Elmer) nach einer ersten 10-minütigen Denaturierung bei 94°C unter Verwendung eines Temperaturprofils mit insgesamt 40 Zyklen aus jeweils 30 scc Denaturierung bei 94°C, Hybridisierung der Primer bei 50°C und DNA-Synthese bei 72°C, sowie einer abschließenden 7-minütigen Inkubation bei 72°C.

35

[0021] Für die Differenzierung der PCR-Produkte schließt sich ein PCR-ELISA (Boehringer) an. Die Digoxingenin-markierten Amplifikate werden mit Hilfe spezifischer biotinmarkierter Sonden an mit Streptavidin beschichteten Mikrotiterplatten immobilisiert. Das gebundene Hybrid kann mit einem Anti-Digoxingenin-Peroxidase Konjugat und einem Farbsubstrat detektiert werden.

40

[0022] Hierfür werden in die Vertiefungen der Streptavidin-beschichteten Mikrotiterplatten jeweils 25 µl Denaturierungslösung (0,2 mol/l NaOH, 0,1% SDS) und 5 µl eines PCR-Produktes gegeben. Es werden pro PCR-Produkt jeweils 9 Vertiefungen beschickt. Nach 10-minütiger Denaturierung erfolgt die Zugabe der 9 verschiedenen Hybridisierungslösungen, die sich aus der jeweiligen biotinylierten Sonde (Endkonzentration 7,5 pmol/ml; Sequenzen s. u.) und Hybridisierungspuffer (Boehringer Mannheim) zusammensetzen.

45

[0023] Nach einer Stunde Schütteln bei 37°C wird die Platte drei- bis fünfmal mit Waschlösung gewaschen und je 200 µl eines Anti-dig-Peroxidase-Konjugates in die Vertiefung gegeben. Nach 30 min Schütteln bei 37°C wird nochmals gewaschen und das Farbsubstrat ABTS in die Vertiefungen pipettiert, woraufhin nach 30 min Schütteln bei 37°C der Farbumschlag photometrisch in einem ELISA-Lesegerät bei 405 nm gemessen werden kann. Es wird ein Referenzfilter von 490 nm verwendet. Es werden also lediglich in den Vertiefungen, in denen durch die Sonden PCR-Produkt und die Anti-dig-Peroxidase am Streptavidin haften, Farbveränderungen auftreten.

50

[0024] In der anliegenden Liste werden die verwendeten Primer sowie die hierzu passenden verwendeten Sonden angegeben:

Verwendete Primer

[0025] Enterovirus:

55

EV1 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3'
 EV2 5'-TCC TCC GGC CCC TGA ATG CG-3'

[0026] *Mycoplasma pneumoniae*:

MP1 5'-AAG GAC CTG CAA GGG TTC GT-3'
 MP2 5'-CTC TAG CCA TTA CCT GCT AA-3'

60

[0027] Influenzavirus Typ A:

InfA NS1 5'-AAG GGC TTT CAC CGA AGA GG-3'
 InfA NS2 5'-CCC ATT CTC ATT ACT GCT TC-3'

65

[0028] Influenzavirus Typ B:

InfB NS1 5'-ATG GCC ATC GGA TCC TCA AC-3'
 InfB NS2 5'-TGT CAG CTA TTA TGG AGC TG-3'

[0029] Adenovirus:

Adh1 5'-GCC GAG AAG GGC GTG CGC AGG TA-3'

DE 197 16 456 C 2

Adh2 5'-ATG ACT TTT GAG GTG GAT CCC ATG GA-3'
[0030] Chlamydia pneumoniae:
CpnA 5'-TGA CAA CTG TAG AAA TAC AGC-3'
CpnB 5'-CGC CTC TCT CCT ATA AAT-3'
5 [0031] Parainfluenzavirus Typ 1:
PIV1 1 5'-CAC ATC CTT GAG TGA TTA AGT TTG ATG A-3'
PIV1 2 5'-ATT TCT GGA GAT GTC CCG TAG GAG AAC-3'
[0032] Parainfluenzavirus Typ 3:
PIV3 1 5'-TAG CAG TAT TGA AGT TGG CA-3'
10 PIV3 2 5'-AGA GGT CAA TAC CAA CAA CTA-3'
[0033] Respiratory Syncytial Virus (RSV):
RSV1 5'-TGT TAT AGG CAT ATC ATT GA-3'
RSV2 5'-TTA ACC ACC AAA GTG TTA GA-3'

15 Sonden (3'-Ende biotinyliert)

[0034] Enterovirus:
EV3 5'-GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA-3'
[0035] Mycoplasma pneumoniae:
20 MP3 5'-ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT A-3'
[0036] Influenzavirus Typ A:
InfA3 5'-GTC CTC ATC GGA GGA CTT GAA TGGAATGAT-3'
[0037] Influenzavirus Typ B:
InfB3 5'-GTC AAG AGC ACC GAT TAT CAC C-3'
25 [0038] Adenovirus:
Adh 3 5'-CTC GAT GAC GCC GCG GTG C-3'
[0039] Chlamydia pneumoniae:
CpnC 5'-TCT TGC TAC CTT CTG TAC TAA C-3'
[0040] Parainfluenzavirus Typ 1:
30 PIV1C 5'-TAC CTT CAT TAT CAA TTG GTA AGT CAA TAT ATG-3'
[0041] Parainfluenzavirus Typ 3:
PIV3C 5'-AAA ATT CCA AAA GAG ACC GGC-3'
[0042] RSV:
RSV3 5'-TAC ACC TGC ATT AAC ACT AA-3'
35 [0043] Vorteilhaft wäre zudem, mit dem Verfahren der "Reversen Hybridsierung" immobilisierte Sonden in separaten Regionen auf einem Trägermaterial anzubringen, auf das dann, lediglich zur Auswertung jeweils PCR-Produkt zu geben wäre.

Patentansprüche

40 1. Verwendung einer Kombination von Primern in einem Multiplex-PCR-Verfahren zum Nachweis von Erregern von Infektionskrankheiten, zur gleichzeitigen Amplifikation mehrerer Zielsequenzen in einem Reaktionsgefäß, in dem eine Patientenprobe mit einer aus einer Mehrzahl von Primern bestehenden Primerlösung in Kontakt gebracht wird, eine Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) veranlaßt wird, und eine Digoxigenin-Markierung vorgenommen wird, dadurch gekennzeichnet, daß
45 die Kombination Primer mit folgenden Sequenzen aufweist:
"Enterovirus"
EV1 5'-ATT GTC ACC ATA AGC AGC CA-3'
EV2 5'-TCC TCC GGC CCC TGA ATG CG-3'
50 "Mycoplasma pneumoniae"
MP1 5'-AAG GAC CTG CAA GGG TTC GT-3'
MP2 5'-CTC TAG CCA TTA CCT GCT AA-3'
"Influenzavirus Typ A"
InfA NS1 5'-AAG GGC TTT CAC CGA AGA GG-3'
55 InfA NS2 5'-CCC ATT CTC ATT ACT GCT TC-3'
"Influenzavirus Typ B"
InfB NS1 5'-ATG GCC ATC GGA TCC TCA AC-3'
InfB NS2 5'-TGT CAG CTA TTA TGG AGC TG-3'
"Adenovirus"
60 Adh1 5'-GCC GAG AAG GGC GTG CGC AGG TA-3'
Adh2 5'-ATG ACT TTT GAG GTG GAT CCC ATG GA-3'
"Chlamydia pneumoniae"
CpnA 5'-TGA CAA CTG TAG AAA TAC AGC-3'
CpnB 5'-CGC CTC TCT CCT ATA AAT-3'
65 "Parainfluenzavirus Typ 1"
PIV1 1 5'-CAC ATC CTT GAG TGA TTA AGT TTG ATG A-3'
PIV1 2 5'-ATT TCT GGA GAT GTC CCG TAG GAG AAC-3'
"Parainfluenzavirus Typ 3"

DE 197 16 456 C 2

PIV3 1 5'-TAG CAG TAT TGA AGT TGG CA-3'	
PIV3 2 5'-AGA GGT CAA TAC CAA CAA CTA-3'	
und	
"Respiratory Syncytial Virus (RSV)"	
RSV1 5'-TGT TAT AGG CAT ATC ATT GA-3'	5
RSV2 5'-TTA ACC AGC AAA GTG TTA GA-3'.	
2. Verwendung einer Kombination von immobilisierten Sonden für ein mit der Kombination von Primern nach Anspruch 1 erzeugtes PCR-Produkt in einem in separate Regionen aufgeteilten Trägermaterial, dadurch gekennzeichnet, daß die Kombination folgende Sonden (3'-Ende biotinyliert) aufweist:	
"Enterovirus"	10
EV3 5'-GAA ACA CGG ACA CCC AAA GTA-3'	
"Mycoplasma pneumoniae"	
MP3 5' ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT A-3'	
"Influenzavirus Typ A"	
Inf A3 5'-GTC CTC ATC GGA GGA CTT GAA TGG AAT GAT-3'	15
"Influenzavirus Typ B"	
InfB3 5'-GTC AAG AGC ACC GAT TAT CAC C-3'	
"Adenovirus"	
Adh 3 5'-CTC GAT GAC GCC GCG GTG C-3'	
"Chlamydia pneumoniae"	20
CpnC 5'-TCT TGC TAC CTT CTG TAC TAA C-3'	
"Parainfluenzavirus Typ 1"	
PIV1C 5'-TAC CTT CAT TAT CAA TTG GTA AGT CAA TAT ATG -3'	
"Parainfluenzavirus Typ 3"	
PIV3C 5'-AAA ATT CCA AAA GAG ACC GGC-3'	25
und	
"RSV"	
RSV3 5'-TAC ACC TGC ATT AAC ACT AA-3'.	
	30
	35
	40
	45
	50
	55
	60
	65

- Leerseite -